



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 39/395 // C07K 16/18, 16/46, C12N 15/62, 5/16, C12P 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/00219</p> <p>(43) 国際公開日 2000年1月6日(06.01.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03433</p> <p>(22) 国際出願日 1999年6月25日(25.06.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/180143 1998年6月26日(26.06.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 佐藤 功(SATO, Koh)[JP/JP] 恒成利明(TSUNENARI, Toshiaki)[JP/JP] 〒412-8543 静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: REMEDIES FOR HYPERCALCEMIC CRISIS</p> <p>(54)発明の名称 高カルシウム血症クリーゼ治療剤</p> <p>(57) Abstract Remedies for hypercalcemic crisis which contain as the active ingredient a substance capable of inhibiting bonding of a parathyroid hormone-associated peptide to its receptor.</p>		

(57)要約

副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む高カルシウム血症クリーゼ治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

高カルシウム血症クリーゼ治療剤

技術分野

本発明は副甲状腺ホルモン関連ペプチド(Parathyroid hormone related protein (PTHrP))とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼ治療剤に関するものである。

背景技術

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症は、全悪性腫瘍患者の 5~20%にみられる重篤な合併症状であり、放置すれば確実に死に至るため、悪性腫瘍の末期的症状であると考えられている。高カルシウム血症のコントロールは患者の治療予後と QOL (Quality of Life) に大きく影響することから、臨床的に重要な役割を持つ。

悪性腫瘍患者における高カルシウム血症は、一般に、腫瘍産生性の体液性骨吸収因子による HHM (Humoral hypercalcemia of malignancy) と、骨に転移又は浸潤した腫瘍の局所的な作用による LOH (Local Osteolytic hypercalcemia) とに大別される。HHM では骨吸収又は骨破壊の亢進によりカルシウムの流出が増加し、腎のカルシウム排泄能の低下とあいまって高カルシウム血症を生ずると考えられている (和田誠基及び永田直一, 内科 69, 644-648)。

高カルシウム血症は、血清カルシウム値が 12mg/dl を超えるとその症状が現れると考えられ、その症状として、初期に食思不振、悪心、嘔吐が悪性腫瘍患者において非特異的に認められる。高カルシウム血症が悪化すると、腎遠位尿細管の障害で水分の濃縮力が低下するために多尿となり、また、悪心、嘔吐により水分が十分に摂取されないため脱水を伴い、腎、皮膚、血管、肺、心、および胃における石灰化が起こる。高カルシウム血症がさらに悪化すると、全身倦怠、嗜眠、錯乱などの意識障害が現れ、ついには昏睡および心停止を起こす恐れがある (ハリソン内科書, 3427、内科学, 1081-1084, 朝倉書店)。

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症のうち HHM を起こす液性因子として、PTH (副

甲状腺ホルモン; Parathyroid Hormone) 様の物質である副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid Hormone related Peptide、以下「PTHrP」という) が Moseley, J. M. らにより見いだされた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987)、84, 5048-5052)。

その後、PTHrP をコードする遺伝子が単離され (Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893) その解析から、ヒト PTHrP は遺伝子の選択的スプライシングに基づく 139、141 及び 173 個のアミノ酸からなる三種が存在すること、並びに血中では全構造を有する PTHrP (1-139) の限定分解に基づく様々なフラグメントが存在することが明らかになった (Baba, H. Clinical Calcium (1995) 5, 229-223)。PTHrP は、N 末端側第 1 位から第 13 位のアミノ酸 13 個のうち 8 個が PTH と同一である他、第 14 位から第 34 位アミノ酸部位においても PTH と類似の立体構造を呈するものと推定され、少なくとも N 末端側においては PTH と共通の PTH/PTHrP 受容体に結合する (Jueppner, H. et al., Science (1991) 254, 1024-1026、Abou-Samra, A-B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 2732-2736)。

PTH/PTHrP 受容体は主に骨と腎に存在し (滋野長平、Clinical Calcium (1995) 5, 355-359)、PTHrP が受容体に結合することにより複数の細胞内シグナル伝達系が活性化されることが知られている。その一つは、アデニルシクラーゼであり、もう一つはフォスホオリパーゼ C である。アデニルシクラーゼの活性化により、細胞内 cAMP 濃度が上昇しプロテインキナーゼ A が活性化される。また、フォスホオリパーゼ C はフォスファチジルイノシトール 4, 5-ビスフォスフォネートを分解してイノシトール 1, 4, 5-トリフォスフォネートとジアシルグリセロールを生じさせる。これらのシグナル伝達系には G 蛋白質が関与する (Coleman, D. T. et al., Biochemical mechanisms of parathyroid hormone action. In: "The parathyroids" (Bilezikian, J. P. et al.), Raven press, New York, (1994) page 239)。PTHrP は、これらのシグナル伝達系を介して、HHM に観察される高カルシウム血症、低リン血症、腎リン再吸収能の低下、腎性 cAMP 排泄の増加などを引き起こす。

このように、PTHrP は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症に密接に関連するのみ

ならず、急激な血中カルシウムの上昇による全身倦怠、嗜眠、錯乱などの意識障害や昏睡にいたる高カルシウム血症クリーゼの原因になっている。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼをきたした場合は、カルシトニン、ステロイド剤、ビスフォスフォネート、リン酸緩衝液、生理食塩水、フルセミドなどを用いて高カルシウム血症と一般状態の改善をはかる。しかしながら、これらの薬剤は連続使用により効果が低減すること、強い副作用が発現すること、又は薬効発現が遅いことなどから、より治療効果が高く副作用の少ない薬剤の使用が期待されている。

特に、高カルシウム血症クリーゼをきたす患者は、急激な血中カルシウムの上昇から死に至る危険性もあるため、一刻も早く血中カルシウム濃度を低下させる必要がある。しかし、現在までのところ、安全で且つ即効的な高カルシウム血症クリーゼの治療薬として満足のいく薬剤はまだ知られていない。

一方、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症治療の新しい試みとして、Kukreja, S. C.らは、ヒト肺ガン細胞又はヒト喉頭ガン細胞を移植して高カルシウム血症を生じた無胸腺マウスに PTHrP に対する中和抗血清を投与すると、血中カルシウム濃度及び尿 cAMP レベルが減少したことを報告している (J. Clin. Invest. (1988) 82, 1798-1802)。佐藤幹二らは、PTHrP 産生ヒト腫瘍を移植したヌードマウスに PTHrP (1-34) に対する抗体を投与すると、高カルシウム血症を低減させ、マウスの生存時間を大幅に延長させたことを報告している (J. bone & Mine. Res. (1993) 8, 849-860)。また、特開平 4-228089 号には、ヒト PTHrP (1-34) に対するマウス／ヒトキメラ抗体が開示されている。

前記のごとく、ヒト型化抗体は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼの緊急処置の目的のために有用であると予想されるが、PTHrP に対するヒト型化抗体は知られておらず、前記文献にはその示唆もなされていない。また、ヒト型化抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、中和活性を示すヒト型化抗体を作製するためには種々の工夫が必要である (例えば、Sato, K. et al., Cancer Res., 53, 851-856, 1993 を参照のこと)。

発明の開示

本発明は、PTHrP とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む高カルシウム血症クリーゼに対する治療剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質により、目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む高カルシウム血症クリーゼ治療剤である。上記物質としては、副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体等が挙げられる。あるいは、上記物質は、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び/又はその修飾物でもよい。また、抗体(モノクローナル抗体を含む)としてはヒト型化又はキメラ化されたもの(例えばヒト型化抗体としてヒト型化 #23-57-137-1 抗体)が挙げられる。

さらに本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼ治療剤に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein: PTHrP) とその受容体 (PTHrP 受容体) との結合を阻害する物質を有効成分として含む高カルシウム血症クリーゼ治療剤である。

「PTHrP と PTHrP 受容体との結合を阻害する物質」とは、PTHrP に結合することにより PTHrP が PTHrP 受容体と結合することを阻害する物質、あるいは PTHrP 受容体に結合することにより PTHrP が PTHrP 受容体と結合することを阻害する物質をいう。前者に該当する物質としては、例えば抗 PTHrP 抗体が挙げられ、後者に該当する物質としては、例えば PTHrP 受容体に対するアンタゴニスト (PTHrP アンタゴニストともいう) が挙げられる。

PTHrP アンタゴニストとしては、ポリペプチドや低分子物質が挙げられる。例

えば、PTHrP に対して拮抗的に PTHrP 受容体に結合する物質（特開平 7-165790 号公報、Peptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 1031-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28 1992, 31 (16) 4026-4033、特表平 5-509098 号公報などに記載のポリペプチド）が挙げられる。なお、これらのポリペプチドは、ペプチド合成の常法手段によって化学合成することができる。

これら PTHrP アンタゴニストは、本来の PTHrP ペプチドと競合して PTHrP 受容体に結合するが、その後のシグナル伝達を阻害してカルシウム濃度の上昇を抑制する機能を有するものである。

また、上記例示のポリペプチドのうち、少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入等の変異が導入されたポリペプチドであって、同等の PTHrP アンタゴニスト活性を有するものも本発明の PTHrP アンタゴニストに含まれる。

本発明の高カルシウム血症クリーゼ治療剤としては、患者あたり、好ましくは 0.1~10000mg/body、さらに好ましくは 0.5~1000mg/body、さらに好ましくは 1~100 mg/body の薬剤を投与後、速やかにカルシウム濃度が低下し、さらに長時間にわたってカルシウム濃度が再上昇しないもの、あるいは顕著に効果が持続するものが好ましい。具体的には、薬剤投与後 24 時間以内、好ましくは 6 時間以内、さらに好ましくは 4 時間以内に、血清補正カルシウム値を 1mg/dL 以上低下させるもの、又は正常化（血清補正カルシウム値 10.4mg/dL 以下）させ若しくは 2 mg/dL 以上低下させるものを、本発明の治療剤として使用することができる。さらに薬剤投与後 24 時間以上、好ましくは 3 日間以上、さらに好ましくは 5 日間以上、さらに好ましくは 7 日間以上、最も好ましくは 10 日間以上にわたり、血清補正カルシウム値が再上昇しない状態を維持し得るもの、又は薬剤投与後前値より 2 mg/dL 以上低下した状態若しくは正常化した状態を維持し得るものが好ましい。

ここでいう血清補正カルシウム値は次式で算出される。

① 血清アルブミン値が 4g/dL 未満の場合

血清補正カルシウム値 (mg/dL) = 実測血清カルシウム値 (mg/dL) + [4.0 - 血清アルブミン値 (g/dL)]

② 血清アルブミン値が 4g/dL 以上の場合

血清補正カルシウム値 (mg/dL) = 実測血清カルシウム値 (mg/dL)

発明を実施するための最良の形態

本発明では、「PTHrP と PTHrP 受容体との結合を阻害する物質」として抗 PTHrP 抗体を例に説明する。

抗 PTHrP 抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体 (W096/33735 号公報) 又はキメラ抗体 (特開平 4-228089 号公報) などの公知の抗体のほか、本発明における抗体 (#23-57-137-1 抗体) などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。

1. 抗 PTHrP 抗体

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼ治療剤の治療効果を有するものであれば、その由来、種類 (モノクローナル、ポリクローナル) および形状を問わない。

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗 PTHrP 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体は PTHrP と結合することにより、PTHrP が PTH/PTHrP 受容体に結合するのを阻害して PTHrP のシグナル伝達を遮断し、PTHrP の生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 により産生される #23-57-137-1 抗体が挙げられる。

なお、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 8 年 8 月 15 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、PTHrP を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒト PTHrP を、Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893 に開示された PTHrP 遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、PTHrP をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的の PTHrP タンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製 PTHrP タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PTHrP の N 末端の 34 個のペプチド(配列番号 75)について、化学合成により作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653

) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1-10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37°C 程度に加温した PEG 溶液 (例えば平均分子量 1000-6000 程度) を通常 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ

マ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で PTHrP に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrP への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる PTHrP を投与して抗 PTHrP 抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞から PTHrP に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990 参照）。

具体的には、抗 PTHrP 抗体を産生するハイブリドーマから、抗 PTHrP 抗体の可変 (V) 領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)

等により行って全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用して目的の mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

目的とする抗 PTHrP 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗 PTHrP 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質 (ヤギ β カゼインなど) をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるト

ランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体 V 領域をコードする DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023 号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計した DNA 配列を、CDR 及び FR 両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR 法により合成する (W098/13388 号公報に記載の方法を参照)。

CDR を介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23-57-137-1抗体は、マウス由来の#23-57-137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体 HSU03868 (GEN-BANK, Defetos M ら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1、FR2 および FR3) 並びにヒト抗体 S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体 S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier AM ら, Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) については FERM BP-5629 として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq λ /pUC19) については FERM BP-5630 として、ブダペスト条約に基づきそれぞれ国際寄託されている。

5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、PTHrP に結合し、PTHrP の活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であつてよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシン

グルチェイン Fv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばババイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

scFv は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。この scFv において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFv における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリリンカーとしては、例えばアミノ酸 12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFv をコードする DNA は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA、および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリリンカー部分をコードする DNA、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦 scFv をコードする DNA が作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って scFv を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗 PTHrP 抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター-1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサー等が挙げられる。

SV40 プロモーター/エンハンサーを使用する場合は Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1 α プロモーター/エンハンサーを使用する場合は Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えば lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。lacZ プロモーターを使用する場合は Ward らの方法 (Nature (1978) 271, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいは araB プロモーターを使用する場合は Better らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えば CHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa 細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞を *in vitro* または *in vivo* で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephrose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせ

せることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

8. 抗体の活性の確認

本発明で使用する抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用する抗 PTHrP 抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、PTHrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗 PTHrP 抗体を含む試料、例えば、抗 PTHrP 抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用する抗体の活性を確認するには、抗 PTHrP 抗体の中和活性を測定する。

9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療又は改善を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり 0.001mg から 1000mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 0.01~100000mg/body、好ましくは 0.1~10000mg/body、さらに好ましくは 0.5~1000mg/body、さらに好ましくは 1~100 mg/body の薬剤の投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗 PTHrP 抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼが生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよ

い。

本発明の抗 PTHrP 抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ベクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗 PTHrP 抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えば Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、マウス抗 PTHrP 抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果 (血中イオン化カルシウム濃度の推移) を示す図である。

図 2 は、マウス抗 PTHrP 抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果 (体重変化) を示す図である。

図 3 は、ヒト型化抗 PTHrP 抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリー

ゼに対する治療効果（血中イオン化カルシウム濃度の推移）を示す図である。

図4は、ヒト型化抗PTHrP抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果（体重変化）を示す図である。

図5は、ヒト型化抗PTHrP抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果（血中イオン化カルシウム濃度の推移）を示す図である。

図6は、ヒト型化抗PTHrP抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果（体重変化）を示す図である。

実施例

以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例等にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍－ヌードマウス移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するマウスモノクローナル抗体及びヒト型化モノクローナル抗体の高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果を検討した。

モデル動物としてヒト膵臓癌FA-6（東京女子医大、佐藤幹二教授より譲渡）あるいはヒト肺癌株LC-6-JCK（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードマウスあるいはヌードラットを用いた。これらのヒト腫瘍株を移植されたヌードマウスまたはヌードラットは、腫瘍の増加に伴い激しい血中カルシウム濃度の上昇がみられ、これに伴い急激な体重減少、全身状態の悪化、ときとして死亡にいたり、いわゆる高カルシウム血症クリーゼと呼ばれるような症状を呈する。この症状をPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体及びヒト型化モノクローナル抗体が改善することを、体重および血中イオン化カルシウム濃度を指標にして評価した。

ヒト腫瘍株の継代維持及びモデル動物の作製

ヒト膵臓癌株FA-6およびヒト肺癌LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoで行った。マウスでの薬効評価には、5週齢雄性ヌードマウス（BALB/cAJcl-nu 日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後、6

週齢の動物を使用した。ラットでの薬効評価には5週齢雄性ヌードラット(F344/N Jcl-rnu 日本クレア)を購入し、マウスと同様に1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。

高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のように行った。すなわち、継代している腫瘍を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊を動物の脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。移植後、腫瘍体積が十分に大きくなり、血中イオン化カルシウム濃度が上昇したのを確認した後、腫瘍体積、血中イオン化カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、高カルシウム血症モデル動物とした。ラット、マウスとも抗体投与群、対照薬投与群及び溶媒（本実験では、リン酸バッファー生理食塩水（PBS））のみを投与した対照群の3群に群分けした。

血中イオン化カルシウム濃度の測定

抗体投与後、2時間、4時間、24時間目（マウスを用いた薬効試験）または1時間、2時間、4時間、24時間目（ラットを用いた薬効試験）に血中イオン化カルシウム濃度を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中イオン化カルシウム濃度は、眼窩（マウス）または尾静脈（ラット）よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca/pHアナライザー（CIBA-CORNING）を用いて測定した。また抗体投与前と投与24時間後の体重も測定した。

腫瘍体積の測定

腫瘍体積は、腫瘍の長径（a mm）および短径（b mm）を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により腫瘍体積として算出した。

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼに対する治療効果の検討は、以下のように行った。

1) マウスモノクローナル抗体（#23-57-137-1）の薬効試験

マウスモノクローナル抗体の薬効試験では、上記で作製、群分けしたモデルマウスに、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）0.1mlに調整した抗体を100μg（100

$\mu\text{g}/0.1\text{ml PBS}/\text{mouse}$)、尾静脈内に単回投与した。対照薬として、既に高カルシウム血症クリーゼの治療に用いられているカルシトニン製剤（製品名：カルシトラン：帝国臓器製薬(株)製）を、 $100\text{U}/\text{kg}$ の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、 $\text{PBS } 0.1\text{ ml}/\text{mouse}$ を尾静脈内に単回投与した。（図 1、図 2）

2) ヒト型化抗体（hMBC（q））の薬効試験

1. 高カルシウム血症モデルマウスでの薬効試験

ヒト型化抗体の薬効試験では、高カルシウム血症モデルマウスに抗体 $30\mu\text{g}/0.1\text{ml PBS}/\text{mouse}$ を尾静脈内に単回投与した。対照薬として、カルシトニン製剤（製品名：エルシトニン：旭化成工業(株)製）を、 $100\text{U}/\text{kg}$ の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、 $\text{PBS } 0.1\text{ ml}/\text{mouse}$ で尾静脈内に単回投与した。（図 3、図 4）

2. 高カルシウム血症モデルラットでの薬効試験

ヒト型化抗体の薬効試験では、高カルシウム血症モデルラットに抗体 $0.5\text{ mg}/1\text{ml PBS}/\text{kg}$ を尾静脈内に単回投与した。対照薬として、カルシトニン製剤（製品名：エルシトニン：旭化成工業(株)製）を、 $1\text{U}/\text{kg}$ の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、 $\text{PBS } 1\text{ml}/\text{kg}$ で尾静脈内に単回投与した。（図 5、図 6）

その結果、マウスモノクローナル抗体及びヒト型化抗体は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症モデルの血中イオン化カルシウム濃度を速やかに低下させた（図 1、図 3、図 5）。カルシトニン製剤の効果は一時的であるのに対し、抗体の作用は即効的、かつ持続的であった。また抗体投与群では、カルシトニン製剤投与群には見られない 24 時間後の体重回復も認められた（図 2、図 4、図 6）。このことから、PTHrP に対する中和活性を有するマウスモノクローナル抗体あるいはヒト型化抗体は、緊急の治療の要求される悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼの治療薬としての有用性が示された。

〔参考例 1〕

抗 PTHrP(1-34)マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒト PTHrP(1-34)に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #23-57-154 および #23-57-137-1 は、以下の通り作製した (Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993)。なお、ヒト PTHrP(1-34)のアミノ酸配列を配列番号 75 に示す。

免疫原として使用するために、PTHrP(1-34) (Peninsula 製) とキャリアタンパクであるサイログロブリンをカルボジイミド (Dojinn) を用いて結合した。サイログロブリンと結合した PTHrP(1-34)を透析し、タンパク濃度として $2 \mu\text{g/ml}$ となるように調製した後、フロイントアジュバント (Difco) と 1:1 で混合し、エマルジョン作製後、16 匹の雌性 BALB/C マウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり $100 \mu\text{g}$ を 11 回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より採血し、血清分離後 R I A バッファーで希釈した抗血清と ^{125}I 標識 PTHrP(1-34)を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していない PTHrP(1-34)を動物あたり $50 \mu\text{g}$ を最終免疫した。

最終免疫 3 日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株 P3x63Ag8U.1 を 50% ポリエチレングリコール 4000 を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を 2×10^4 / ウェルの細胞数で 85 枚の 96 穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別は HAT 培地を用いて行った。

ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT 培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化 RIA 法にて PTHrP 認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15% FCS を含む RPMI-1640 培地に OPI-supplement (Sigma) を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP(1-34)との結合能の強いクローン #23-57-154 および #23-57-137-1 を得た。

なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 8 年 8 月 1 5 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

〔参考例 2〕ヒト PTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローニング

ヒト PTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1 の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローニングした。

(1) mRNA の調製

ハイブリドーマ#23-57-137-1 からの mRNA を Quick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech 社)を用いて調製した。ハイブリドーマ#23-57-137-1 の細胞を抽出バッファーで完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、oligo(dT)-Cellulose Spun Column にて mRNA を精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA 沈殿物を溶出バッファーに溶解した。

(2) マウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の cDNA の作製および増幅

(i) #23-57-137-1 抗体 H 鎖 V 領域 cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE 法には 5'-Ampli FINDER RACE kit (CLONETECH 社)を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA 合成に使用するプライマーは、マウス H 鎖定常領域 (C 領域) とハイブリダイズする MHC2 プライマー (配列番号 1) を用いた。前記のようにして調製した mRNA 約 2 μ g を鋳型として MHC2 プライマー 10pmole を加え、逆転写酵素と 52°C、30 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

6 N NaOH で RNA を加水分解 (65°C、30 分間) した後、エタノール沈殿により

cDNA を精製した。T4RNA リガーゼで 37℃で 6 時間、室温で 16 時間反応することにより、合成した cDNA の 5' 末端に Ampli FINDER Anchor(配列番号 42) を連結した。これを鋳型として PCR により増幅するためのプライマーとして Anchor プライマー(配列番号 2) および MHC-GI プライマー(配列番号 3) (S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991) を使用した。

PCR 溶液は、その 50 μ l 中に 10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl₂、2.5 ユニットの TaKaRa Taq (宝酒造)、10pmole の Anchor プライマー、並びに MHC-GI プライマー及び Ampli FINDER Anchor を連結した cDNA の反応混合物 1 μ l を含有する。この溶液に 50 μ l の鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Model 480J(Perkin Elmer) を用い、94℃にて 45 秒間、60℃にて 45 秒間、72℃にて 2 分間の温度サイクルで 30 回行った。

(ii) #23-57-137-1 抗体 L 鎖 V 領域の cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE 法には 5'-Ampli Finder RACE Kit(Clontech)を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA 合成に使用するプライマーは、oligo-dT プライマーを用いた。前記のように調製した mRNA 約 2 μ g を鋳型として oligo-dT プライマーを加え、逆転写酵素と 52℃、30 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。6N NaOH で RNA を加水分解 (65℃、30 分間) した後、エタノール沈殿により cDNA を精製した。合成した cDNA の 5' 末端に前記 Ampli FINDER Anchor を T4RNA リガーゼで 37℃で 6 時間、室温で 16 時間反応させることにより連結した。

マウス L 鎖 λ 鎖定常領域の保存配列から PCR プライマー MLC (配列番号 4) を設計し、394 DNA/RNA Synthesizer (ABI 社) を用いて合成した。PCR 溶液は、その 100 μ l 中に 10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl₂、2.5 ユニットの AmpliTaq (PERKIN ELMER)、50pmole

の Anchor プライマー(配列番号 2)、並びに MLC(配列番号 4)および Ampli FINDER Anchor を連結した cDNA の反応混合物 $1\mu\text{l}$ を含有する。この溶液に $50\mu\text{l}$ の鉍油を上層した。PCR は Thermal Cycler Model480J (Perkin Elmer) を用い、 94°C にて 45 秒間、 60°C にて 45 秒間、 72°C にて 2 分間の温度サイクルで 35 回行った。

(3) PCR 生成物の精製および断片化

前記のようにして PCR 法により増幅した DNA 断片を、3 % Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H 鎖 V 領域として約 550bp 長、L 鎖 V 領域として約 550bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、 10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$)、 1mM EDTA 溶液 $20\mu\text{l}$ に溶解した。得られた DNA 溶液 $1\mu\text{l}$ を制限酵素 XmaI (New England Biolabs) により 37°C で 1 時間消化し、次いで制限酵素 EcoRI (宝酒造) により 37°C で 1 時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により DNA を回収した。

こうして、5'-末端に EcoRI 認識配列を有し、3'-末端に XmaI 認識配列を有するマウス H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得た。

上記のようにして調製したマウス H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む EcoRI-XmaI DNA 断片と EcoRI 及び XmaI で消化することにより調製した pUC19 ベクターを DNA ライゲーションキット ver.2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16°C で 1 時間反応させ連結した。次に $10\mu\text{l}$ の上記連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) $100\mu\text{l}$ に加え、この細胞を氷上で 15 分間、 42°C にて 1 分間、さらに氷上で 1 分間静置した。次いで $300\mu\text{l}$ の SOC 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を加え 37°C にて 30 分間インキュベートした後、 $100\mu\text{g/ml}$ 又は $50\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、 0.1mM の IPTG、 $20\mu\text{g/ml}$ の X-gal を含む LB 寒天培地または 2xYT 寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 上にこ

の大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を 100 $\mu\text{g/ml}$ 又は 50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含有する LB 培地または 2 \times YT 培地 2 ml で 37℃にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機 PI-100 Σ (クラボウ) 又は QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製し、塩基配列の決定を行った。

(4) マウス抗体 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を使い、DNA Sequencer 373A (ABI 社 Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号 5) 及び M13 Primer RV (宝酒造) (配列番号 6) を使い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマ #23-57-137-1 に由来するマウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを MBC1H04、L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを MBC1L24 と命名した。プラスミド MBC1H04 および MBC1L24 に含まれるマウス #23-57-137-1 抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列 (対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号 57、65 に示す。これらのアミノ酸配列を、H 鎖 V 領域の断片については配列番号 46、L 鎖 V 領域の断片については配列番号 45 に示す。

なお、前記プラスミド MBC1H04 および MBC1L24 を有する大腸菌は *Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) および *Escherichia coli* JM109 (MBC1L24) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 8 年 8 月 15 日に、*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) については FERM BP-5628、*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24) については FERM BP-5627 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体 #23-57-137-1 の CDR の決定

H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、そ

れぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を Kabat らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることにより CDR 領域を表 1 に示すごとく決定した。

なお、L鎖V領域の CDR 1～3 のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号 59～61 に示し、H鎖V領域の CDR 1～3 のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号 62～64 に示した。

表 1

V領域	配列番号	CDR 1	CDR 2	CDR 3
H鎖V領域	5 7	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	6 5	23-34	50-60	93-105

〔参考例 3〕キメラ抗体の構築

(1) キメラ抗体H鎖の構築

(i) H鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1-S1 (配列番号7) はV領域のリーダー配列の5'-側をコードするDNAにハイブリダイズし、且つKozak コンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。前方プライマーMBC1-a (配列番号8) はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライスドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、50 μ lの反応

混合液に鋳型 DNA として $0.07 \mu\text{g}$ のプラスミド MBC1H04、プライマーとして MBC1-a および MBC1-S1 をそれぞれ 50pmole、2.5U の TaKaRa Ex Taq、0.25mM の dNTP 含む条件で添付緩衝液を使用して $50 \mu\text{l}$ の鉱油を上層し、 94°C にて 1 分間、 55°C にて 1 分間、 72°C にて 2 分間の温度サイクルで 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

437bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit (B10101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液 $20 \mu\text{l}$ に溶解した。得られた DNA 溶液 $1 \mu\text{l}$ を制限酵素 BamHI、Hind III (宝酒造) により 37°C 1 時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により DNA を回収した。

上記のようにして調製したマウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む Hind III-BamHI DNA 断片を Hind III および BamHI で消化することにより調製した pUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマー M13 Primer M4 および M13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ #23-57-137-1 に由来するマウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側に Hind III 認識配列及び Kozak 配列、3'-側に BamHI 認識配列を持つプラスミドを MBC1H/pUC19 と命名した。

(ii) cDNA タイプのマウス-ヒトキメラ H 鎖の作製のための H 鎖 V 領域の構築
ヒト H 鎖 C 領域 C γ 1 の cDNA と連結するために、上記のようにして構築したマウス H 鎖 V 領域を PCR 法により修飾した。H 鎖 V 領域のための後方プライマー MBC1HVS2 (配列番号 9) は V 領域のリーダー配列の最初をコードする配列の 2 番のアスパラギンをグリシンに変換し、且つ Kozak コンセンサス配列 (Kozak, M. et

al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びに Hind III および EcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2 (配列番号 10) はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5'-側の配列をコードしApa I および SmaI 認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 μ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taqを2.5U、0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50 μ lの鋳油を上層して94℃1分間、55℃1分間、72℃1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。

得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素EcoRI および SmaI (宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI および SmaI で消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RVをプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRI および Hind III 認識配列並びにKozak配列、3'-側にApaI および SmaI 認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

(iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C γ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- Δ E-RVh-PM-1-f (W092/19759 参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a(W092/19759 参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

DHFR- Δ E-RVh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 α プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-BamHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI部位が欠失したDHFR- Δ E-RVh-PM1-fをHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRIおよびHind III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

プラスミド MBC1HcDNA/pUC19 を EcoRI および BamHI で消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含む DNA 断片を、EcoRI および BamHI で消化することにより調製した発現ベクターpCOS1 に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドを MBC1HcDNA/pCOS1 と命名した。なお、発現ベクターpCOS1 は、HEF-PMh-g γ 1 (W092/19759 参照) から、EcoRI および SmaI 消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI アダプター (宝酒造) を連結することにより構築した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミド MBC1HcDNA/pUC19 を EcoRI および BamHI で消化し、得られたキメラ抗体H鎖配列を含む DNA 断片を、EcoRI および BamHI で消化することにより調製した発現プラスミド pCH01 に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドを MBC1HcDNA/pCH01 と命名した。なお、発現ベクターpCH01 は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (W092/19759 参照) から、EcoRI および SmaI 消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

(2) ヒトL鎖定常領域の構築

(i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含む pUC19 ベクターを構築するために、Hind III 部位欠失 pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター 2 μ g を 20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100 mM KCl、8 Uの Hind III (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNA をエタノール沈殿により回収した。

回収した DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6 Uの Klenow フラグメント (GIBCO BRL) を含有する 50 μ l の反応混合液中で室温にて 20 分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクターDNA をエタノール沈殿により回収した。

回収したベクターDNAを50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、5%(v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 UのT4 DNA リガーゼ (GIBCO BRL)を含有する反応混合液10 μ l中で16℃で2時間反応させ、自己連結させた。反応混合液5 μ lを大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ lに加え、氷上で30分間静置した後、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。SOC 培地 500 μ lを加えて、37℃で1時間インキュベーションした後、X-gal と IPTG を表面に塗布した2 \times YT 寒天培地 (50 μ g/ml アンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にまき、37℃で一夜培養して形質転換体を得た。

形質転換体を、50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT 培地 20ml で37℃一夜培養し、菌体画分から Plasmid Mini Kit (QIAGEN)を用いて、添付の処方に従ってプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミドを Hind III で消化し、Hind III 部位が欠失していることを確認したプラスミドを pUC19 Δ Hind III と命名した。

(ii) ヒトL鎖 λ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

ヒト抗体L鎖 λ 鎖C領域は、Mcg⁺ Ke⁺ Oz⁻、Mcg⁻ Ke⁻ Oz⁻、Mcg⁻ Ke⁻ Oz⁺、Mcg⁻ Ke⁺ Oz⁻の少なくとも4種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)。#23-57-137-1 マウスL鎖 λ 鎖C領域と相同性を有するヒト抗体L鎖 λ 鎖C領域をEMBLデータベースで検索した結果、アイソタイプが Mcg⁺ Ke⁺ Oz⁻ (accession No.X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) のヒト抗体L鎖 λ 鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1 マウスL鎖 λ 鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

そこで、このヒト抗体L鎖 λ 鎖C領域をコードする遺伝子の構築をPCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer (ABI 社)を用いて行った。HLAMB1 (配列番号11) および HLAMB3 (配列番号13) はセンス DNA 配列を有し、HLAMB2 (配列番号12) および HLAMB4 (配列番号14) はアンチセンス DNA 配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を

有する。

外部プライマーHLAMBS (配列番号 15)、HLAMBR (配列番号 16) は HLAMB1、HLAMB4 とそれぞれ相同な配列を有しており、また HLAMBS は EcoRI、Hind III、BlnI 認識配列を、HLAMBR は EcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一 PCR で HLAMB1-HLAMB2 と HLAMB3-HLAMB4 の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二 PCR でアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBS および HLAMBR を添加し、第三 PCR により全長 DNA を増幅させた。

PCR は TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を使い、添付の処方に従って行った。第一 PCR では、5 pmole の HLAMB1 および 0.5 pmole の HLAMB2 と 5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する 100 μ l の反応混合液、あるいは 0.5 pmole の HLAMB3 および 5 pmole の HLAMB4 と 5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する 100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鉱油を上層して 94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行った。

第二 PCR は、反応液を 50 μ l ずつ混合し、50 μ l の鉱油を上層して 94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 3 回行った。

第三 PCR は、反応液に外部プライマーHLAMBS および HLAMBR を各 50 pmole ずつ添加し、94℃にて 1 分間、60℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

第三 PCR 産物の DNA 断片を 3 % 低融点アガロースゲル (NuSieve GTG Agarose, FMC) で電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、添付の処方に従ってゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、100 mM NaCl、8 U の EcoRI (宝酒造) を含有する 20 μ l の反応混合液中で 37℃にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA 溶液 8 μ l に溶解した。

プラスミド pUC19 Δ Hind III 0.8 μ g を同様に EcoRI で消化し、フェノールお

よびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミド pUC19 Δ Hind III を 50 mM Tris-HCl (pH9.0)、1 mM MgCl₂、アルカリホスファターゼ(E.coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液 50 μ l 中で 37°C、30 分間反応させ脱リン酸処理 (BAP 処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿により回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 10 μ l に溶解した。

上記の BAP 処理したプラスミド pUC19 Δ Hind III 1 μ l と先の PCR 産物 4 μ l を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を 50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 2 ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

上記プラスミドについて、クローニングされた DNA の塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には 373A DNA sequencer (ABI 社) を用い、プライマーには M13 Primer M4 および M13 Primer RV (宝酒造) を用いた。その結果、クローニングされた DNA の内部に 12bp の欠失があることが判明した。この DNA を含むプラスミドを C λ Δ /pUC19 と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマー HCLMS (配列番号 17)、HCLMR (配列番号 18) を新たに合成し、PCR で再度正しい DNA の構築を行った。

第一 PCR で欠失 DNA を含むプラスミド C λ Δ /pUC19 を鋳型とし、プライマー HLAMBS と HCLMR、HCLMS と HLAMB4 で反応を行った。PCR 産物をそれぞれ精製し、第二 PCR でアセンブリを行った。さらに外部プライマー HLAMBS および HLAMB4 を添加し、第三 PCR により全長 DNA を増幅させた。

第一 PCR では、鋳型として C λ Δ /pUC19 0.1 μ g、プライマー HLAMBS および HCLMR 各 50pmole、あるいは HCLMS および HLAMB4 各 50pmole、5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鉱油を上層して 94°C にて 1 分間、60°C にて 1 分間、72°C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

PCR 産物 HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp) をそれぞれ 3 % 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。第二 PCR では精製 DNA 断片各 40ng、1 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 20 μ l の反応混合液を用い、25 μ l の鋳油を上層して 94°C にて 1 分間、60°C にて 1 分間、72°C にて 1 分間の温度サイクルを 5 回行った。

第三 PCR では、第二 PCR 反応液 2 μ l、外部プライマー HLAMBS、HLAMB4 各 50 pmole、5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鋳油を上層した。PCR は、94°C にて 1 分間、60°C にて 1 分間、72°C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。第三 PCR 産物である 357bp の DNA 断片を 3 % 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片 0.1 μ g を EcoRI で消化した後、BAP 処理したプラスミド pUC19 Δ Hind III にサブクローニングした。大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 2 ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドについて塩基配列を M13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNA sequencer (ABI 社) にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドを C λ /pUC19 とした。

(iii) ヒト L 鎖 κ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

プラスミド HEF-PM1k-gk (W092/19759) から L 鎖 κ 鎖 C 領域をコードする DNA 断片を PCR 法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA synthesizer (ABI 社) を用いて合成した前方プライマー HKAPS (配列番号 19) は EcoRI、Hind III、BlnI 認識配列を、後方プライマー HKAPA (配列番号 20) は EcoRI 認識配列を有するように設計した。

鋳型となるプラスミド HEF-PM1k-gk 0.1 μ g、プライマー HKAPS、HKAPA 各 50 pmole、5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する 100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鋳油を上層した。94°C にて 1 分間、60°C にて 1 分間、72°C にて 1

分間の反応を 30 サイクル行った。360bp の PCR 産物を 3 % 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られた DNA 断片を EcoRI で消化した後、BAP 処理したプラスミド pUC19 Δ Hind III にクローニングした。大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50 μg/ml アンピシリンを含有する 2 × YT 培地 2 ml で一夜培養し、菌体画分から QIaprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドの塩基配列を M13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造)を用い、373A DNA sequencer(ABI 社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドを Cκ/pUC19 とした。

(3) キメラ抗体 L 鎖発現ベクターの構築

キメラ#23-57-137-1 抗体 L 鎖発現ベクターを構築した。プラスミド Cλ/pUC19、Cκ/pUC19 のヒト抗体定常領域の直前にある Hind III、BlnI 部位に、#23-57-137-1 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1 抗体 L 鎖 V 領域および L 鎖 λ 鎖または L 鎖 κ 鎖定常領域をコードする pUC19 ベクターを作製した。EcoRI 消化によってキメラ抗体 L 鎖遺伝子を切り出し、HEF 発現ベクターへサブクローニングを行った。

すなわち、プラスミド MBC1L24 から#23-57-137-1 抗体 L 鎖 V 領域を PCR 法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI 社)を用いて行った。後方プライマー-MBCCHL1 (配列番号 21) は Hind III 認識配列と Kozak 配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) を、前方プライマー-MBCCHL3 (配列番号 22) は BglII、EcoRI 認識配列を有するように設計した。

PCR は、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.1 μg の MBC1L24、プライマーとして MBCCHL1 および MBCCHL3 を各 50pmole、1 μl の AmpliTaq(PERKIN ELMER) を含有する 100 μl の反応混合液を用い、50 μl の鉱油を上層して 94℃にて 45 秒間、60℃にて 45 秒間、72℃にて 2 分間の温

度サイクルで 30 回行った。

444bp の PCR 産物を 3 % 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 20 μ l に溶解した。PCR 産物 1 μ l をそれぞれ 10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、50mM NaCl、8 U の Hind III (宝酒造) および 8 U の EcoRI (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 8 μ l に溶解した。

プラスミド pUC19 1 μ g を同様に Hind III および EcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ(E.coli C75, 宝酒造) で BAP 処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 10 μ l に溶解した。

BAP 処理したプラスミド pUC19 1 μ l と先の PCR 産物 4 μ l を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) に前述と同様に形質転換した。これを 50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 寒天培地にまき、37°C で一夜培養した。得られた形質転換体を、50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 2 ml で 37°C で一夜培養した。菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドを CHL/pUC19 とした。

プラスミド C λ /pUC19、C κ /pUC19 各 1 μ g をそれぞれ 20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM KCl、8 U の Hind III (宝酒造) および 2 U の BlnI (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した後、37°C で 30 分間 BAP 処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNA をエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 10 μ l に溶解した。

#23-57-137-1 L鎖V領域を含むプラスミドCHL/pUC19から8 μ gを同様にHind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

このL鎖V領域DNA 4 μ lをBAP処理したプラスミドC λ /pUC19またはC κ /pUC19 各1 μ lにサブクローニングし、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地3mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドMBC1L(λ)/pUC19、MBC1L(κ)/pUC19とした。

プラスミドMBC1L(λ)/pUC19 およびMBC1L(κ)/pUC19をそれぞれEcoRIで消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bpのDNA断片をGENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7 μ gをEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した。回収したDNA断片をBAP処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、656bpのDNA断片をGENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

BAP処理したHEFベクター2 μ lを上記プラスミドMBC1L(λ)またはMBC1L(κ)EcoRI断片各3 μ lと連結し、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8 UのHind III (宝酒造) および2 UのPvuI (宝酒造)を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じること

より、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれ MBC1L(λ)/neo、MBC1L(κ)/neo とした。

(4) COS-7 細胞のトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを COS-7 細胞で一過性に発現させた。

すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミド MBC1HcDNA/pCOS1 と MBC1L(λ)/neo または MBC1HcDNA/pCOS1 と MBC1L(κ)/neo の組み合わせで、Gene Pulser 装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションにより COS-7 細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されている COS-7 細胞 0.8ml に、各プラスミド DNA $10 \mu\text{g}$ を加え、1,500V、 $25 \mu\text{F}$ の静電容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を 2% の Ultra Low IgG ウシ胎児血清(GIBCO)を含有する DMEM 培地(GIBCO)に懸濁し、10cm 培養皿を用いて CO_2 インキュベーターにて培養した。72 時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISA の試料に供した。また、COS-7 細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSII キット(BioRad)を用いてキット添付の処方に従って行った。

(5) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO_3 , $0.02\% \text{NaN}_3$)で $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAG0) $100 \mu\text{l}$ で固相化し、 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファー(50mM Tris-HCl , 1mM MgCl_2 , 0.1M NaCl , $0.05\% \text{Tween20}$, $0.02\% \text{NaN}_3$, 1% 牛血清アルブミン(BSA)、 $\text{pH}7.2$)でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させた COS 細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1 時間室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAG0) $100 \mu\text{l}$ を加えた。1 時間室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄の後、 1mg/ml の基質溶液(Sigma104、

p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 λ Purified(The Binding Site)を用いた。

(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のための ELISA プレートでは、次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレートの各穴を固相化バッファーで $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヒト PTHrP(1-34) (ペプチド研究所) $100 \mu\text{l}$ で固相化した。 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させた COS 細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAGO) $100 \mu\text{l}$ を加えた。室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄の後、 1mg/ml の基質溶液 (Sigmal04、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

その結果、キメラ抗体は、ヒト PTHrP(1-34)に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が λ 鎖あるいは κ 鎖のいずれであっても抗体の PTHrP(1-34)に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 λ 鎖を用いて構築した。

(6) CHO 安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドを CHO 細胞 (DXB11)に導入した。

すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO 細胞用発現プラスミド MBC1HcDNA/pCH01 と MBC1L(λ)/neo または MBC1HcDNA/pCH01 と MBC1L(κ)/neo の組み合わせで、Gene Pulser 装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションにより CHO 細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素 PvuI で切断して直鎖 DNA にし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿で DNA を回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/ml の

細胞濃度で懸濁されている CHO 細胞 0.8ml に、各プラスミド DNA 10 μ g を加え、1,500V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を 10% ウシ胎児血清(GIBCO)を添加した MEM- α 培地(GIBCO)に懸濁し、3 枚の 96 穴プレート(Falcon)を用いて CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10% ウシ胎児血清(GIBCO)および 500mg/ml の GENETICIN(G418Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含 MEM- α 培地(GIBCO)の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2 週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定 ELISA にて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて 2% の Ultra Low IgG ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含 MEM 培地を用いて、大量培養を行った。培養 3 ないし 4 日目に培養上清を回収し、0.2 μ m のフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。

CHO 細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROS プロテイン A カラム (PerSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記 ELISA 系にて測定した。

〔参考例 4〕 ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体 H 鎖の構築

(i) ヒト型化 H 鎖 V 領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1 抗体 H 鎖を、PCR 法による CDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体 S31679(NBRF-PDB, Cuisinier A.M.ら、Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993)由来の FR を有するヒト型化#23-57-137-1 抗体 H 鎖 (バージョン "a") の作製のために 6 個の PCR プライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマー-MBC1HGP1 (配列番号 23) 及び MBC1HGP3 (配列番号 24) はセンス DNA 配列を

有し、そして CDR グラフティングプライマー-MBC1HGP2(配列番号 25)及び MBC1HGP4(配列番号 26)はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 15 から 21bp の相補的配列を有する。外部プライマー-MBC1HVS1(配列番号 27)及び MBC1HVR1(配列番号 28)は CDR グラフティングプライマー-MBC1HGP1 及び MBC1HGP4 とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマー-MBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3 および MBC1HGP4 は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出は crush and soak 法 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ 1 nmole の CDR-グラフティングプライマーを 6 %変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさの DNA 断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak 法にてゲルから回収し 20 μ l の 10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA 溶液に溶解した。PCR は、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100 μ l の反応混合液に上記の様に調製した CDR-グラフティングプライマー-MBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3 および MBC1HGP4 をそれぞれ 1 μ l、0.25mM の dNTP、2.5U の TaKaRa Ex Taq を含む条件で添付緩衝液を使用して 94℃にて 1 分間、55℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 50pmole の外部プライマー-MBC1HVS1 及び MBC1HVR1 を加え、同じ温度サイクルを 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 4 % Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA 溶液 20 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラス

ミドを hMBCHv/pUC19 と命名した。

(ii) ヒト型化H鎖 cDNA のためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV領域のリーダー配列の5'-側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M. ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIII およびEcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つC領域の5'-側の配列をコードしApaI およびSmaI 認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq(宝酒造)を用い、鋳型DNAとして0.4 μ gのhMBCHv/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3% Nu Sieve GTG アガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRI およびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRI およびHindIII 認識配列及びKozak配列、3'-側にApaI およびSmaI 認識配列を持つプラスミドをhMBCHv/pUC19と命名した。

(2) ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

hPM1抗体H鎖cDNAの配列を含むプラスミドRVh-PM1f-cDNAをApaI およびBamHI

にて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域C γ 1を含み、5'-末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒト型化H鎖バージョン"a"の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。

hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。

(3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築

(i) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体の作製

ヒト型化抗体とマウス(キメラ)抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L(λ)/neo及びhMBC1L(λ)/neo各10 μ gを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, AflIII(宝酒造)10Uを含有する反応混合液100 μ l中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L(λ)/neo

から 6282bp の断片(h1 とする)および 1022bp の断片(h2 とする)を、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

回収した c 1、h 1 断片各 1 μ g について BAP 処理を行った。DNA をフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液 10 μ l に溶解した。

BAP 処理した c 1 及び h 1 断片 1 μ l をそれぞれ h 2、c 2 断片 4 μ l に連結し(4℃、一夜)、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンプシリンを含有する 2 \times YT 培地 2ml で培養し、菌体面分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、ApaI(宝酒造) 2 U、または BamHI(宝酒造)8U、HindIII(宝酒造)8U を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37℃、1 時間消化した。c 1-h 2 が正しく連結されていれば、ApaI で 5560/1246/498bp、BamHI/HindIII で 7134/269bp の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

これをヒト FR1,2/マウス FR3,4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを h/mMBC1L(λ)/neo とした。一方、h1-c2 のクローンが得られなかったので、pUC ベクター上で組換えてから HEF ベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体 L 鎖 V 領域を含むプラスミド hMBC1La λ /pUC19、及び FR3 内の 91 位(Kabat の規定による 73/酸番号 87 位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体 L 鎖 V 領域を含むプラスミド hMBC1Ld λ /pUC19 を鋳型として用いた。

プラスミド MBC1L(λ)/pUC19、hMBC1La λ /pUC19 及び hMBC1Ld λ /pUC19 の各 10 μ g を 10mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、0.01%(w/v)BSA、HindIII 16U、AflIII 4U を含有する反応混合液 30 μ l 中で 37℃、1 時間消化した。反応液を 2% 低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミド MBC1L(λ)/pUC19

から 215bp(c2'), プラスミド hMBC1La λ /pUC19 および hMBC1Ld λ /pUC19 からそれぞれ 3218bp(hal', hdl') の DNA 断片を GENECLAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

hal', hdl' 断片をそれぞれ c2' 断片に連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 2ml で培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミド m/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19 とした。

得られたプラスミド m/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19 を EcoRI で消化した。それぞれ 743bp の DNA 断片を 2% 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液 20 μ l に溶解した。

各 DNA 断片 4 μ l を前述の BAP 処理した HEF ベクター 1 μ l に連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 2ml で培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、HindIII(宝酒造)8U、PvuI(宝酒造)2U を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37 $^{\circ}$ C にて 1 時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば 5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば 4378/2926bp の消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウス FR1,2/ヒト FR3,4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを m/hMBC1La λ /neo、m/hMBC1Ld λ /neo とした。

(ii) FR1/FR2 ハイブリッド抗体の作製

CDR1 内にある SnaBI 切断部位を利用することによって、同様に FR1 と FR2 のハイブリッド抗体を作製した。

プラスミド MBC1L(λ)/neo 及び h/mMBC1L(λ)/neo の各 10 μ g を 10mM Tris-HCl(pH7.9)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、0.01%(w/v)BSA、SnaBI(宝酒造)

6 Uを含有する反応混合液 20 μ l 中で 37℃にて 1 時間消化した。次に 20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01%(w/v)BSA, PvuI 6 Uを含有する反応混合液 50 μ l 中で 37℃にて 1 時間消化した。

反応液を 1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミド MBC1L(λ)/neo から 4955bp(m1)および 2349bp(m2)、プラスミド h/mMBC1L(λ)/neo から 4955bp(hm1)および 2349bp(hm2)の各 DNA 断片を GENECLANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA 溶液 40 μ l に溶解した。

m1, hm1 断片 1 μ l をそれぞれ hm2, m2 断片 4 μ l に連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アピシリンを含有する 2×YT 培地 2ml で培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, ApaI(宝酒造)8U、または ApaLI(宝酒造)2U を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37℃にて 1 時間消化した。

各断片が正しく連結されていれば、ApaI で 7304bp、ApaLI で 5560/1246/498bp(m1-hm2)、ApaI で 6538/766bp、ApaLI で 3535/2025/1246/498bp(hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒト FR1/マウス FR2, 3, 4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを hmmMBC1L(λ)/neo、マウス FR1/ヒト FR2/マウス FR3, 4 ハイブリッド抗体 L 鎖をコードする発現ベクターを mhmMBC1L(λ)/neo とした。

(4) ヒト型化抗体 L 鎖の構築

ヒト型化#23-57-137-1 抗体 L 鎖を、PCR 法による CDR-グラフトニングにより作製した。ヒト抗体 HSU03868(GEN-BANK, Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来の FR1, FR2 および FR3、並びにヒト抗体 S25755(NBRF-PDB)由来の FR4 を有するヒト型化#23-57-137-1 抗体 L 鎖 (バージョン "a") の作製のために 6 個

の PCR プライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマー-MBC1LGP1(配列番号 29)及び MBC1LGP3(配列番号 30)はセンス DNA 配列を有し、そして CDR グラフティングプライマー-MBC1LGP2(配列番号 31)及び MBC1LGP4(配列番号 32)はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 15 から 21bp の相補的配列を有する。外部プライマー-MBC1LVS1(配列番号 33)及び MBC1LVR1(配列番号 34)は CDR グラフティングプライマー-MBC1LGP1 及び MBC1LGP4 とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマー-MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 および MBC1LGP4 は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出は crush and soak 法(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ 1nmole の CDR-グラフティングプライマーを 6 %変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさの DNA 断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し 20 μ l の 10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA 溶液に溶解した。

PCR は、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100 μ l の反応混合液に上記の様に調製した CDR-グラフティングプライマー-MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 および MBC1LGP4 をそれぞれ 1 μ l、0.25mM の dNTP、2.5U の TaKaRa Ex Taq を含む条件で添付緩衝液を使用して 94℃にて 1 分間、55℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、この反応混合液に 50pmole の外部プライマー-MBC1LVS1 及び MBC1LVR1 を加え、さらに同じ温度サイクルで 30 回反応させた。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3 %Nu Sieve GTG アガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BIO101)

を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドを hMBCL/pUC19 と命名した。しかしながら CDR4 の 104 位 (Kabat の規定によるアミノ酸番号 96 位) のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマー MBC1LGP10R (配列番号 35) を設計し、合成した。PCR は TaKaRa Taq (宝酒造) を用い、100 μ l の反応混合液に鋳型 DNA として 0.6 μ g のプラスミド hMBCL/pUC19、プライマーとして MBC1LVS1 及び MBC1LGP10R をそれぞれ 50pmole、2.5U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) 0.25mM の dNTP を含む条件で添付の緩衝液を使用して 50 μ l の鉱油を上層して 94℃にて 1 分間、55℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3 % Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングした。

M13 Primer M4 プライマー及び M13 Primer RV プライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドを HindIII および BlnI で消化し、416bp の断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を HindIII および BlnI で消化することにより調製したプラスミド C λ /pUC19 に導入し、プラスミド hMBC1La λ /pUC19 と命名した。このプラスミドを EcoRI で消化し、ヒト型化 L 鎖をコードする配列を含む配列をプラスミド pCOS1 に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化 L 鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドを hMBC1La λ /pCOS1 と命名した。ヒト型化 L 鎖バージョン "a" の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) を配列番号 66 に示す。また、バージョン a のアミノ酸配列を配列番号 47 に示す。

バージョン"b"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"b"では43位(Kabatの規定によるアミノ酸番号43位)のグリシンをプロリンに、49位(Kabatの規定によるアミノ酸番号49位)のリジンをアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R(配列番号36)とプライマーMBC1LVS1によりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI、HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIIで消化し、HindIIIおよびAflIIIで消化したhMBC1La λ /pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb λ /pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb λ /pCOS1と命名した。

バージョン"c"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"c"では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13 Primer RVによりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1La λ /pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc λ /pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc λ /pCOS1と命名した。

バージョン"d"、"e"及び"f"をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に"a"、"b"、"c"バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変

うにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順に hMBC1Lg λ /pCOS1 および hMBC1Lh λ /pCOS1 と命名した。

バージョン"i"、"j"、"k"、"l"、"m"、"n" および"o" を PCR 法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号 41)とプライマー-VIRV(λ)(配列番号 43)によりプラスミド hMBC1La λ /pUC19 を鋳型として PCR を行い、得られた DNA 断片を ApaI および BlnI で消化し、ApaI および BlnI で消化することにより調製したプラスミド hMBC1Lg λ /pUC19 にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドを hMBC1Lx λ /pUC19 (x = i, j, k, l, m, n, o) とし、このプラスミドを EcoRI 消化し、ヒト型化 L 鎖をコードする配列を含む配列をプラスミド pCOS1 の EcoRI 部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化 L 鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドを hMBC1Lx λ /pCOS1 (x = i, j, k, l, m, n, o) と命名した。バージョン"j"、"l"、"m" および"o" の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号 67、68、69、70 に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 48、49、50、51 に示す。

バージョン"p"、"q"、"r"、"s" および"t" は、バージョン"i"、"j"、"m"、"l" または"o" のアミノ酸配列の 87 位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3 内にある制限酵素 Aor51HI 切断部位を利用して、バージョン"h"を、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l" または"o" とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミド hMBC1Lx λ /pCOS1 (x = i, j, m, l, o) 中、CDR3 並びに FR3 の一部及び FR4 を含む Aor51HI 断片 514bp を除き、ここに発現プラスミド hMBC1Lh λ /pCOS1 中、CDR3 並びに FR3 の一部及び FR4 を含む Aor51HI 断片 514bp をつなぐことにより 91 位(Kabat の規定によるアミノ酸番号 87 位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l" および"o" の 91 位(Kabat の規定によるアミノ酸番号 87 位)のチロシンがイソロイシンに置換さ

れたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r" および"t" とし、得られたプラスミドを hMBC1Lx λ /pCOS1 (x = p, q, s, r, t) と命名した。バージョン"q"、"r"、"s" および"t" の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）をそれぞれ配列番号 71、72、73、74 に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 52、53、54、55 に示す。

プラスミド hMBC1Lq λ /pCOS1 を HindIII および EcoRI で消化し、HindIII および EcoRI で消化したプラスミド pUC19 にサブクローニングし、プラスミド hMBC1Lq λ /pUC19 と命名した。

ヒト型化 L 鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表 2 に示す。

表 2 配列表におけるアミノ酸の位置

(Kabat の規定によるアミノ酸番号)

バージョン	3 6	4 3	4 5	4 7	4 9	8 0	8 7
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラ

ギン酸、I はイソロイシンを示す。

なお、前記プラスミド hMBC1HcDNA/pUC19 および hMBC1Lq λ /pUC19 を有する大腸菌は *Escherichia coli* JM109(hMBC1HcDNA/pUC19) および *Escherichia coli* JM109(hMBC1Lq λ /pUC19)として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、*Escherichia coli* JM109(hMBC1HcDNA/pUC19)については FERM BP-5629、*Escherichia coli* JM109(hMBC1Lq λ /pUC19)については FERM BP-5630 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) COS-7 細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを COS-7 細胞で一過性に発現させた。すなわち鎖ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミド hMBC1HcDNA/pCOS1 と h/mMBC1L(λ)/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と m/hMBC1La λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と m/hMBC1Ld λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1 と hmmMBC1L(λ)/neo、または hMBC1HcDNA/pCOS1 と mhmMBC1L(λ)/neo との組み合わせを、Gene Pulser 装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションにより COS-7 細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されている COS-7 細胞 0.8ml に、各プラスミド DNA 10 μ g を加え、1,500V、25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%の Ultra Low IgG ウシ胎児血清(GIBCO)を含有する DMEM 培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm 培養皿を用いて CO₂ インキュベーターにて培養した。72 時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISA の試料に供した。

ヒト型化#23-57-137-1 抗体の一過性発現では、プラスミド hMBC1HcDNA/pCOS1 と hMBC1Lx λ /pCOS1 ($x = a \sim t$) のいずれかの組み合わせを Gene Pulser 装置(Bio Rad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法により COS-7 細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清を ELISA に供した。

また、COS-7 細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精

製は、AffiGel Protein A MAPSII キット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

(6) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃)で 1 µg/ml の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAGO)100 µl で固相化し、200 µl の希釈バッファー(50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させた COS-7 細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1 時間室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAGO)100 µl を加えた。1 時間室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄の後、1mg/ml の基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に 405nm での吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 λ Purified(The Binding Site)を用いた。

(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のための ELISA プレートを、次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレートの各穴を固相化バッファーで 1 µg/ml の濃度に調製したヒト PTHrP(1-34) 100 µl で固相化した。200 µl の希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させた COS-7 細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体(TAGO) 100 µl を加えた。室温にてインキュベートし PBS-Tween20 で洗浄の後、1 mg/ml の基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に 405nm での吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

(7) 活性確認

(i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン" a "とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン" a "で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン" a "をヒト型化抗体のH鎖として供した。

(ii) ハイブリッド抗体の活性

(ii-a) FR 1, 2 / FR 3, 4 ハイブリッド抗体

L鎖が h/mMBC1L(λ) の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1Laλ あるいは m/hMBC1Ldλ の場合はいずれもキメラ#23-57-137-1 抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR3, 4 はヒト型化抗体として問題ないが、FR1, 2 内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(ii-b) FR 1 / FR 2 ハイブリッド抗体

L鎖が hhmMBC1L(λ) の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L(λ) の場合はキメラ#23-57-137-1 抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR1, 2 のうち FR1 はヒト型化抗体として問題ないが、FR2 内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(iii) ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン" a " から" t " の各ターフを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン" j "、" l "、" m "、" o "、" q "、" r "、" s "、" t " を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHrP結合能を示した。

(8) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO 細胞用発現プラスミド hMBC1HcDNA/pCHO1 と hMBC1Lm λ /pCOS1 または hMBC1HcDNA/pCHO1 と hMBC1Lq λ /pCOS1 あるいは hMBC1HcDNA/pCHO1 と hMBC1Lr λ /pCOS1 の組み合わせで、Gene Pulser 装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションにより CHO 細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素 PvuI で切断して直鎖 DNA にし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿で DNA を回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されている CHO 細胞 0.8ml に、各プラスミド DNA 10 μ g を加え、1,500V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を 10% ウシ胎児血清(GIBCO)添加、MEM- α 培地(GIBCO)に懸濁し、96 穴プレート(Falcon)を用いて CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10% ウシ胎児血清(GIBCO)および 500mg/ml の GENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含 MEM- α 培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2 週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定 ELISA にて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて 2 %の Ultra Low IgG ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含 MEM- α 培地を用いて、大量培養を行った。培養 3 ないし 4 日目に培養上清を回収し、0.2 μ m のフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。CHO 細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROS プロテイン A カラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記 ELISA 系にて測定した。

〔参考例 5〕中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株 ROS17/2.8-5 細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5 細胞を、10% 牛胎児血清(GIBCO)を含む Ham's F-12 培地(GIBCO) 中にて、CO₂ インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5 細胞を 96 穴プレートに 10⁴ 細胞/100 μ l/穴で蒔込み 1 日間培養し、4mM の Hydrocortisone と 10%牛胎児血清を含む Ham's F-12 培地(GIBCO)に交換する。さらに 3 ないし 4 日間培養した後、260 μ l の Ham's F-12 培地(GIBCO)にて洗浄し、1 mM のイソブチル-1-メチル キサンチン(IBMx, SIGMA)および 10%の牛胎児血清と 10mM の HEPES を含む 80 μ l の Ham's F-12 を加え、30 分間 37°C でインキュベートした。

中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ 10 μ g/ml、3.3 μ g/ml、1.1 μ g/ml および 0.37 μ g/ml の群、10 μ g/ml、2 μ g/ml、0.5 μ g/ml および 0.01 μ g/ml の群、または 10 μ g/ml、5 μ g/ml、1.25 μ g/ml、0.63 μ g/ml および 0.31 μ g/ml の群に段階希釈し、4ng/ml に調製した PTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体と PTHrP(1-34)の混合液 80 μ l を各穴に添加した。各抗体の最終濃度は上記抗体濃度の 4 分の 1 になり、PTHrP(1-34)の濃度は 1 ng/ml になる。10 分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBS にて 3 回洗浄したした後、100 μ l の 0.3%塩酸 95%エタノールにて細胞内の cAMP を抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)付属の EIA バッファー 120 μ l を添加し cAMP を抽出後、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)添付の処方に従って cAMP を測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有する L 鎖バージョンのうち、91 位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第平 10-180143 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼ治療剤が提供される。

上記物質は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症モデル動物での薬効試験において、血中カルシウム濃度を対照薬投与群または溶媒投与の対照群と比較して即効的、かつ持続的に作用することから、緊急処置を必要とする悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼの治療剤として有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 10 : 合成 DNA

配列番号 11 : 合成 DNA

配列番号 12 : 合成 DNA

配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

配列番号 15 : 合成 DNA

配列番号 16 : 合成 DNA

配列番号 17 : 合成 DNA

配列番号 18 : 合成 DNA

配列番号 19 : 合成 DNA
配列番号 20 : 合成 DNA
配列番号 21 : 合成 DNA
配列番号 22 : 合成 DNA
配列番号 23 : 合成 DNA
配列番号 24 : 合成 DNA
配列番号 25 : 合成 DNA
配列番号 26 : 合成 DNA
配列番号 27 : 合成 DNA
配列番号 28 : 合成 DNA
配列番号 29 : 合成 DNA
配列番号 30 : 合成 DNA
配列番号 31 : 合成 DNA
配列番号 32 : 合成 DNA
配列番号 33 : 合成 DNA
配列番号 34 : 合成 DNA
配列番号 35 : 合成 DNA
配列番号 36 : 合成 DNA
配列番号 37 : 合成 DNA
配列番号 38 : 合成 DNA
配列番号 39 : 合成 DNA
配列番号 40 : 合成 DNA
配列番号 41 : 合成 DNA
配列番号 42 : 合成 DNA
配列番号 43 : 合成 DNA
配列番号 44 : 合成 DNA

請求の範囲

1. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
2. 物質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニストである請求項1記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
3. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体である請求項1記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
4. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び／又はその修飾物である請求項1記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
5. 抗体がヒト型化又はキメラ化されたものである請求項3又は4記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
6. ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1抗体である請求項5記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
7. 抗体がモノクローナル抗体である請求項3又は4記載の高カルシウム血症クリーゼ治療剤。
8. 高カルシウム血症クリーゼが、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症クリーゼである請求項1～7のいずれか1項に記載の治療剤。

図 1

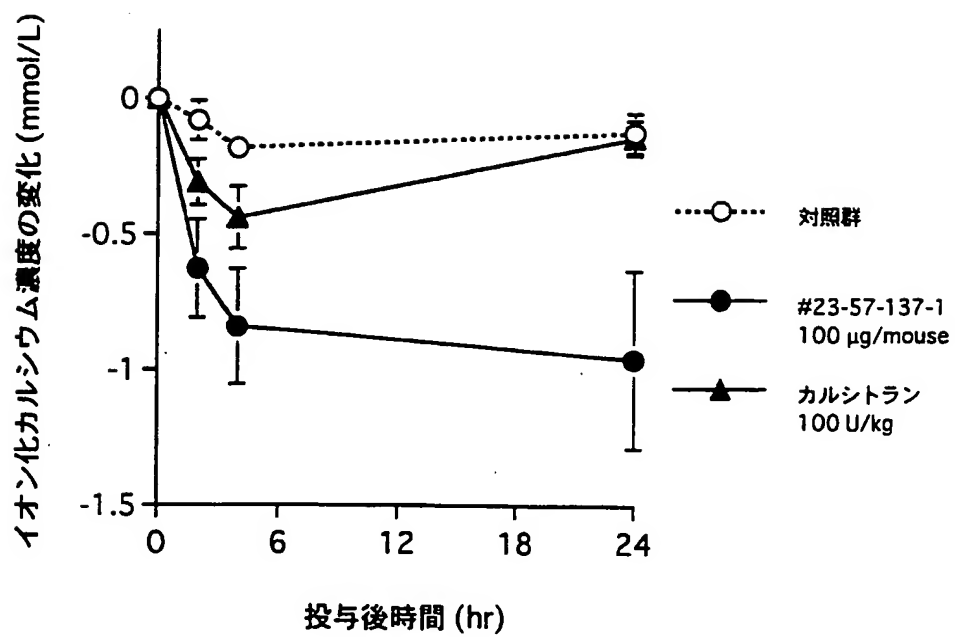


図 2

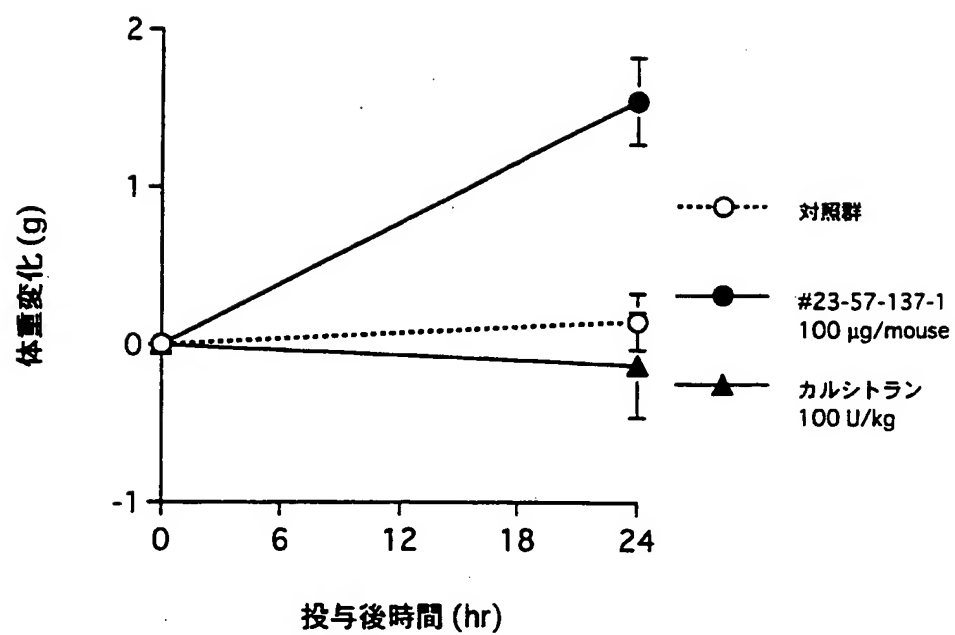


図 3

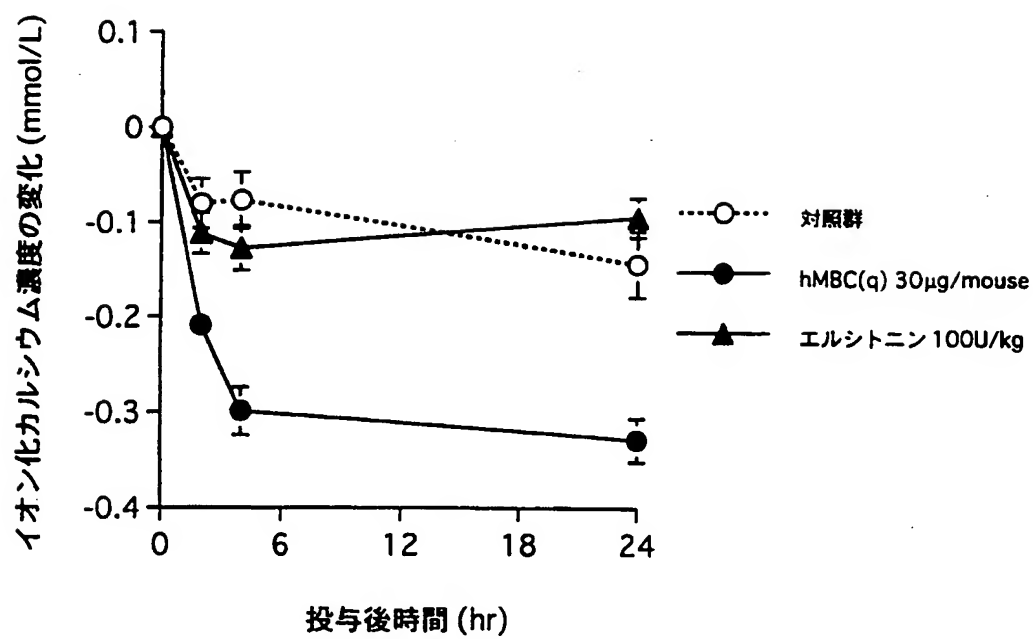


図 4

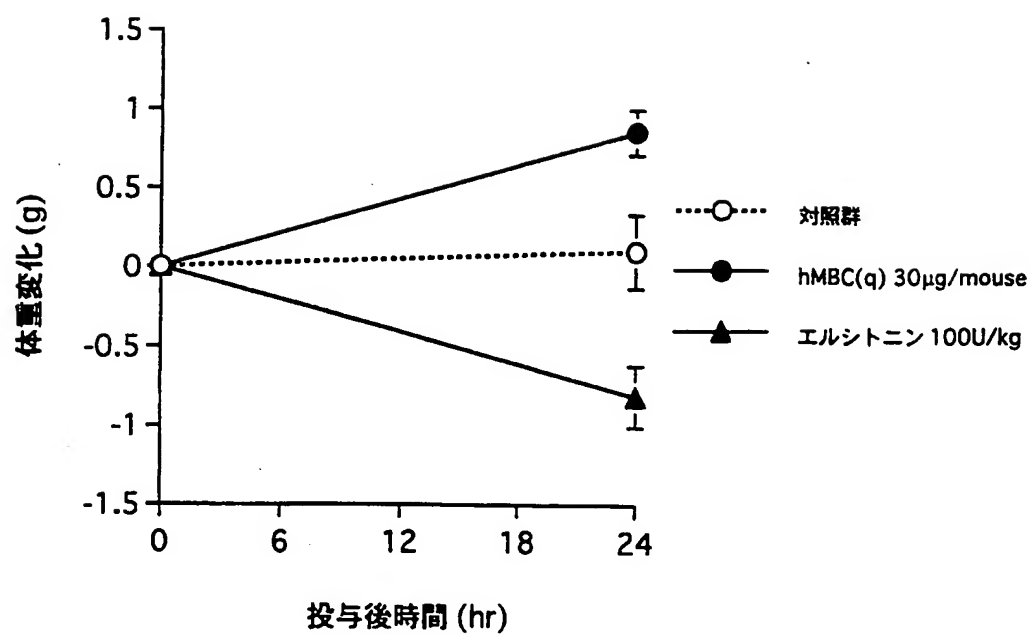


図 5

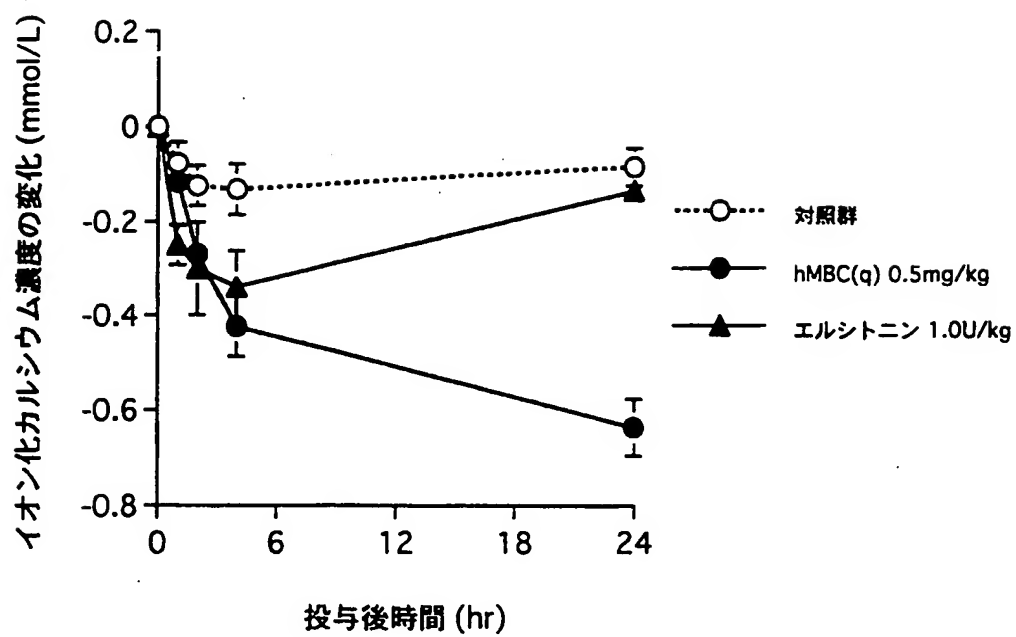
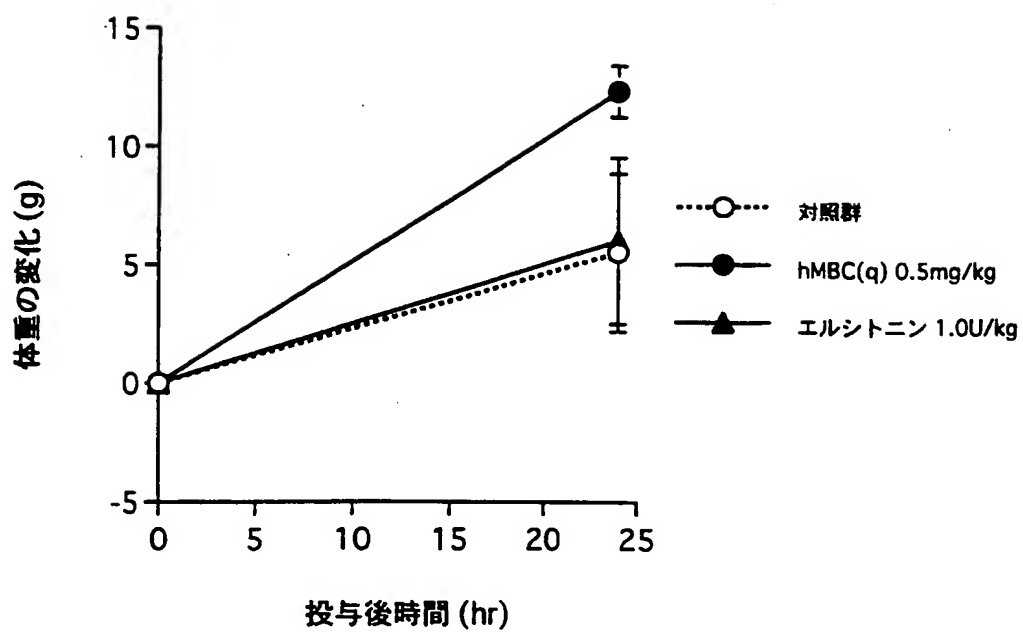


図 6



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Therapeutic agent for treating hypercalcemia crisis

<130> PH-652-PCT

<150> JP98/180143

<151> 1998-06-26

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

aaatagccct tgaccaggca

20

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

ctggttcggc ccacctctga aggttccaga atcgatag

38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ggatcccggg tcagrggaag gtggraaca

29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gttttcccag tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

gtctaagctt ccaccatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

tgttggatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttcac catgggggtt gggctg

36

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tttcccgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgacca g

41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gtctgaattc aagcttagta cttggccagc ccaaggccaa ccccacggtc accctgttcc 60

cgccctcctc tgaggagctc caagccaaca aggccacact agtgtgtct

109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

ggtttggtgg tctccactcc cgccttgacg gggctgccat ctgccttcca ggccactgtc 60
acagctcccg ggtagaagtc actgatacaga cacactagtg tggccttggt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

ggagtggaga ccaccaaacc ctccaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 60
ctgagcctga cgcccgagca gtggaagtcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

tgttgaattc ttactatgaa cattctgtag gggccactgt ctctccacg gtgctccctt 60
catgcgtgac ctggcagctg tagcttctgt gggacttcca ctgctc 106

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta cttggccagc ccaaggccaa ccc

43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tgttgaattc ttactatgaa

20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

caacaagtac gcggccagca gctacctgag cctgacgcc

39

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtagctgctg gccgcgtact tgttgttgct ctgtttgga

39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gtctgaattc aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc

46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

tggtgaattc ttactaacac tctcccctgt tgaa

34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

gtctaagctt ccaccatggc ctggactcct ctctt

35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

tgttgaattc agatctaact acttacctag gacagtgacc ttggtccc

48

<210> 23

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

gtctaagctt ccaccatggg gtttgggctg agctgggttt tcctcgttgc tcttttaaga 60
gggtgtccagt gtcagggtgca gctgggtggag tctgggggag gcgtgggtcca gcctgggagg 120
tccctgag 128

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

accattagta gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg gcgattcacc 60
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 120
gacac 125

<210> 25

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

```
ctaccaccac tactaatggt tgccaccac tccagcccct tgcctggagc ctggcggacc 60
caagacatgc catagtact gaaggtgaat ccagaggctg cacaggagag tctcagggac 120
ctcccaggct gg                                     132
```

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

```
tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc cccagtaagc aaagtaagtc 60
atagtagtct gtctgcaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag          110
```

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

gtctaagctt ccaccatggg gtttgggctg

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg

30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

acaaagcttc caccatggcc tggactcctc tcttcttctt ctttgttctt cattgctcag 60
gttctttctc ccagcttgtg ctgactcaat cgccctctgc cctgcctcc ctgggagcct 120
cgggtcaagct cac 133

<210> 30

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acaggatgatg ggattcctga tcgcttcctca ggctccagct 60
ctggggctga gcgctacctc accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

ctgtggcttc catcttgctt aagtttcatc aagtaccgag ggcccttctc tggtgctgc 60
tgatgccatt caatggtgta cgtactgtgc tgactactca aggtgcaggt gagcttgacc 120
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttggtccct ccgccgaaca ccctcacaaa 60
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcctcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

acaaagcttc caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

cttggatccg ggctgacct

19

<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

cttggatccg ggctgacctt ggacgggtcag ttggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60
ttgttcctta attgt 75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

aaaggatcct taagatccat caagtaccga gggggcttct ctg

43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37

acaaagctta gcgctacctc accatctcca gcctccagcc tgagga

46

<210> 38

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

cttggatccg ggctgacctt ggacggtcag ttggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gatatagtca gcctcatcct c 111

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

cttctctggc tgctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct

42

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

cgagggccct tctctggctg ctgctg

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 42

cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg

35

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

ggcttggagc tcctcaga

18

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

gacagtgggtt caaagttttt

20

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80
Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly
 115

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

```
<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 -15 -10 -5
 gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 -1 1 5 10
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 agt agc tat ggc atg tct tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 30 35 40 45
 gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 50 55 60
 gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 acc cta tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 80 85 90
 ttt tac tgt gca aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384
 Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly
 95 100 105
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

<210> 58

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 58

```
atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
      -15          -10          -5
gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
      -1  1          5          10
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15          20          25
agt agc tat ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      30          35          40          45
gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
      50          55          60
gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
```

65	70	75	
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg			336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
80	85	90	
tat tac tgt gcg aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc			384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly			
95	100	105	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca			411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
110	115		

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1

5

10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 65

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15

-10

-5

tct ttc tcc caa ctt gtg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

-1

1

5

10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15	20	25	
acg tac acc att gaa tgg tat cag caa cag cca ctc aag cct cct aag	192		
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys			
30	35	40	45
tat gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240		
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly			
	50	55	60
att cct gat cgc ttc tct gga tcc agc tct ggt gct gat cgc tac ctt	288		
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu			
	65	70	75
agc att tcc aac atc cag cca gaa gat gaa gca atg tac atc tgt ggt	336		
Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly			
	80	85	90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tat gtt ttc ggc ggt ggg	384		
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly			
	95	100	105
acc aag gtc act gtc cta ggt cag ccc	411		
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro			
110	115		

<210> 66

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58).. (411)

<400> 66

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt   48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15              -10              -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc   96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
          -1   1              5              10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt   144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
          15              20              25

acg tac acc att gaa tgg cat cag cag cag cca gag aag ggc cct cgg   192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
          30              35              40              45

tac ttg atg aaa ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg   240
Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
          50              55              60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc   288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
          65              70              75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt   336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
          80              85              90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg   384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
          95              100              105

```

acc aaa ctg acc gtc cta ggt cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 67

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 67

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys

```

30          35          40          45
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

          50          55          60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

          65          70          75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly

          80          85          90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

          95          100          105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110          115

```

<210> 68

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 68

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt   48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc   96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1   1          5          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt   144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag   192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30          35          40          45

tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg   240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
          50          55          60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc   288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
          65          70          75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt   336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
          80          85          90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg   384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
          95          100          105

acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc   411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110          115

```

<210> 69

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58).. (411)

<400> 69

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt   48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc   96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1   1           5           10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt   144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15           20           25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg   192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
      30           35           40           45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg   240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

```

```

          50          55          60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

          65          70          75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly

          80          85          90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

          95          100          105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110          115

```

<210> 70

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 70

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc tti gtt ctt cat tgc tca ggt 48

```

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
-15 -10 -5
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
-1 1 5 10
ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
15 20 25
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
30 35 40 45
tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
50 55 60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
65 70 75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
80 85 90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

<210> 71

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 71

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30          35          40          45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
          50          55          60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu

```

65	70	75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt			336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly			
80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg			384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly			
95	100	105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc			411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
110	115		

<210> 72

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 72

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt			48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly			
-15	-10	-5	
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc			96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 73

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 00/00219

PCT/JP99/03433

<220>

<221> CDS

WO 00/00219

PCT/JP99/03433